

## 구강백반증에서 상피세포와 섬유모세포의 염색체 불안정성 분석

권정화, 홍두표, 김기열, 김형준<sup>1)</sup>, 최영욱<sup>2)</sup>, 유미현<sup>3)\*</sup>, 김진\*

연세대학교 치과대학 구강증양연구소, 구강병리학교실, 연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실<sup>1)</sup>,  
한국전기연구원<sup>2)</sup>, 남서울대학교 치위생학과<sup>3)</sup>

### 〈ABSTRACT〉

#### Analysis of the Chromosomal Instability in Epithelial Cells and Fibroblasts of Oral Leukoplakia

Jeong Hwa Kwon, Du Pyo Hong, Ki Yeol Kim, Hyung Jun Kim<sup>1)</sup>,  
Young Wook Choi<sup>2)</sup>, Mi Heon Ryu<sup>3)\*</sup>, Jin Kim\*

Oral Cancer Research Institute and Department of Oral Pathology, Brain Korea 21 Project, Yonsei  
University College of Dentistry, Department of Oral and Maxillofacial Surgery<sup>1)</sup>,  
Yonsei University College of Dentistry, Korea Electrotechnology Research Institute<sup>2)</sup>,  
Department of Dental Hygiene, Namseoul University<sup>3)</sup>

Oral squamous cell carcinoma(OSCC) occurs through a multistep process in which accumulated genetic alterations leads to malignant transformation. Oral leukoplakia is a common premalignant lesion in oral mucosa and the incidence of cancer progression into SCC has been reported to be 0~43%. The genetic alterations of oncogenes, tumor suppressor genes and DNA repair genes occur during carcinogenesis. In order to evaluate the role of epithelial cells in the early stage of carcinogenesis, we analyzed the alterations of genetic heterogeneity in epithelial cells of oral leukoplakia samples, using Laser capture microdissection(LCM). The incidence rate of microsatellite instability(MSI) and loss of heterozygosity(LOH) were analysed from the DNA of epithelial cells from 16 leukoplakia samples using adjacent fibroblasts as a normal control. In this study, LOH was found in epithelial cells of all 16 cases of leukoplakias while MSI has been observed in 3 cases. Interestingly, the fibroblasts showed LOH and MSI in some cases, which was confirmed by DNA sequencing. Taken together, this study showed that leukoplakia has multiple genetic alterations in fibroblasts as well as in epithelial cells, suggesting that interaction between epithelial cells and fibroblasts might be involved in the early step of carcinogenesis.

*Key words* : Multistep carcinogenesis, Loss of heterozygosity(LOH), Microsatellite instability(MSI), Epithelial dysplasia.

### I. 서론

\* Correspondence : Jin Kim, Department of Oral Pathology, Yonsei University College of Dentistry, Sinchondong 134, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Tel : 02-2228-3030, E-mail : jink@yuhs.ac

MiHeon Ryu, Department of Dental Hygiene, Namseoul University, Maejuri 21, Seongwhaneup, Cheonan, Chungnam 707-330, Tel : 041-580-2560, E-mail : apollon@nsu.ac.kr

\* 본 논문은 학술진흥재단 중점연구사업(김진, 홍두표, 김기열; KRF-2005-005-J05901)과 신진교수연구비(유미현; KRF-2006-331-E00310)와 일부 한국전기연구원 위탁과제연구비(최영욱) 지원에 의해 연구되었음.

구강암은 인체에 발생하는 전체 악성종양의 2~3%로 나타나며 이 중 구강편평세포암종(oral squamous cell carcinoma)이 구강 내에서 생기는 모든 악성종양의 90% 이상을 차지한다<sup>1)</sup>. 구강편평세포의 종양화는 여러 단계의 발생 순서를 거치는 다단계 발생과정(multistep carcinogenesis)으

로 일어나는데<sup>1)</sup> 구강백반증(oral leukoplakia)은 구강편평 세포암종의 대표적인 전암병소이며, 상피이형성의 정도에 따라 0~43%의 빈도로 악성으로 진행된다<sup>2-6)</sup>.

암의 발생과 진행에 관여하는 종양유전자(oncogene)와 종양억제 유전자(tumor suppressor gene) 중 종양억제 유전자의 변이 여부를 파악하기 위한 방법으로 이형접합성소실(loss of heterozygosity, LOH) 분석법을 사용한다. 이형접합성소실은 부계와 모계로부터 각각 얻은 2개의 이형접합체(heterozygous allele) 중 하나의 대립유전자에 소실이 발생하는 것으로 주로 종양억제 유전자의 위치를 밝히는 데에 사용된 분석법이다. LOH 발생은 암의 발달과 진행, 임상적인 특징 등과 관련이 있다고 추측되고 있으며 주로 현미부수체 표지자(microsatellite marker)를 이용하여 분석한다. 구강편평세포암종에서 LOH는 다양한 염색체 위치에서 연구되고 있는데, 최근까지 2p, 3p, 4q, 8p, 9p, 11p, 13q, 17p, 21q 등의 LOH 발현이 알려져 있고<sup>7-18)</sup> 구강백반증에서는 3p, 4q, 5q, 9p, 17p 등의 위치가 LOH 연구에 이용되었다<sup>19-23)</sup>.

한편 DNA 수복 유전자의 이상으로 나타나는 결과 중 대표적인 것으로 현미부수체불안정성(microsatellite instability, MSI)이 있다. 현미부수체는 2~5개의 염기서열이 일정 횟수 이상 반복되어 나타나는 것을 말하며 이들 반복구조가 DNA 복제과정에서의 오류로 인해 유전자의 반복부위의 길이가 달라진 것을 MSI라고 한다<sup>24,25)</sup>. MSI가 발생한 세포는 유전자의 돌연변이가 존재하기 때문에 이로 인한 암의 발생 가능성이 높다고 생각되고 있다<sup>26-28)</sup>.

그러나 구강편평세포암종의 전암병소인 구강백반증에서의 이형접합성소실 등 유전자 변이를 다룬 연구는<sup>29-31)</sup> 다른 암에서처럼 활발히 보고되고 있지는 않으며, 다단계 구강암 발생 과정의 초기 단계인 구강백반증에서 종양 억제유전자의 역할에 대한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 초기단계 구강암발생과정에서 종양억제 유전자의 유전자 변이에 대하여 분석하고자 구강백반증 조직을 대상으로 레이저 포획 미세절제법(Laser Capture Microdissection, LCM)을 이용하여 상피세포와 섬유모세포를 분리추출한 후 LOH의 발생 빈도를 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구 대상

2001년부터 2005년까지 연세대학교 치과대학부속병원 구강악안면외과와 구강내과에서 생검을 통해 구강백반증 진단을 받은 환자의 조직 중 염증이 없고 상피세포와 섬유모세포의 분리 추출이 가능한 16예의 조직을 연구에 이용하였다. 정상 대조군으로는 각 예마다 같은 환자의 조직에서 구강 백반증의 상피 세포에 인접하여 있는 결합 조직의 섬유모세포를 이용하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 레이저 포획 미세절제

(Laser Capture Microdissection: LCM)

실험에 선정된 16예의 검체로부터 얻은 파라핀 포매 조직을 5 $\mu$ m 두께로 절단하여 hematoxylin 염색을 하고 이를 Veritas<sup>TM</sup> Microdissection(Arcturus, CA, USA) 기계를 사용하여 상피와 섬유모세포를 각각 미세절제하여 분리추출하였다(Fig. 1).

#### 2) 이형접합성소실 분석

(Analysis of Loss of Heterozygosity)

레이저 포획 미세절제 방법으로 얻어진 세포를 G-spin<sup>TM</sup> kit(Intron Ltd, Seongnam, Kor)를 이용하여 DNA를 추출하였다. Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) 표지자를 이용하여 중합효소연쇄반응 후 band의 발현을 통해 존재 여부가 확인된 DNA를 LOH/MSI 분석에 이용하였다.

LOH/MSI 분석에 사용한 표지자로는 구강편평세포암종<sup>7,33)</sup>과 구강백반증<sup>18)</sup> 조직에서 LOH가 많이 나타나는 유전자의 위치를 탐지하는 24가지의 현미부수체 표지자를 선정하였고(Table 1) 선정된 표지자를 이용하여 16예의 상피세포와 섬유모세포 DNA를 각각 중합효소연쇄반응한 후 증폭된 산물을 8% polyacrylamide gel에서 1시간 동안 전기영동하였다. 각 표지자의 중합효소연쇄반응 시 조건은 Table 2에 표시하였다. 구강 백반증 상피세포의 전기영동 결과를 같은 환자의 정상 대조군으로 사용한 섬유모세포의 전기영동 결과와 비교하여 새로운 band가 추가되어 나타나는 경우를 현미부수체 불안정성(MSI)으로, 하나의 band가 완전히 소실되

거나 band의 밀도가 40% 이상 감소된 경우를 이형접합성소실(LOH)로 정의하였다. Band 밀도의 감소 정도는 cloning sequencing을 시행하여 LOH가 확인된 산물 중 두 band의 밀도 차이가 가장 적은 예를 기준으로 하였다(Fig. 2).

### 3) 통계학적 분석(Statistical Analysis)

유전자 위치별 유전자 변이가 일어나는 조직의 위치를 비교하기 위해 SPSS 통계프로그램 ver 14.00(SPSS Co. Inc., Illinois, CA, USA)을 이용하여 Non parametric Chi-square test로 검증하였고, 상피이형성의 유무에 따른 LOH 빈도 비교를 위해 Crosstab test법을 이용하였다. p-value가 0.05 이하인 경우를 유의한 결과로 간주하였다.

## III. 연구 결과

### 1. 연구 대상자의 임상적 특징

연구대상 환자 16명의 성별 분포로는 남성 13명, 여성 3명으로 성비(M:F ratio)는 남성이 4배 호발하였고 평균 연령은 56.25세였다. 구강백반증의 발생 부위로는 혀점막이 4예, 혀 측면이 4예, 혀 아랫면이 1예, 하악 치은이 4예, 상악 치은이 1예, 구후삼각부위가 2예였다(Table 3). 연구대상 환자 중 4명은 경도의 상피이형성을 동반한 예로 진단되었다.

### 2. 현미부수체 불안정성(MSI)과 이형접합성소실(LOH) 분석

#### 1) 구강백반증 상피세포에서의 LOH

구강백반증 상피 세포의 LOH는 중합효소연쇄반응의 결과물 확인이 가능하였던 16명의 환자에서 모두 LOH가 관찰

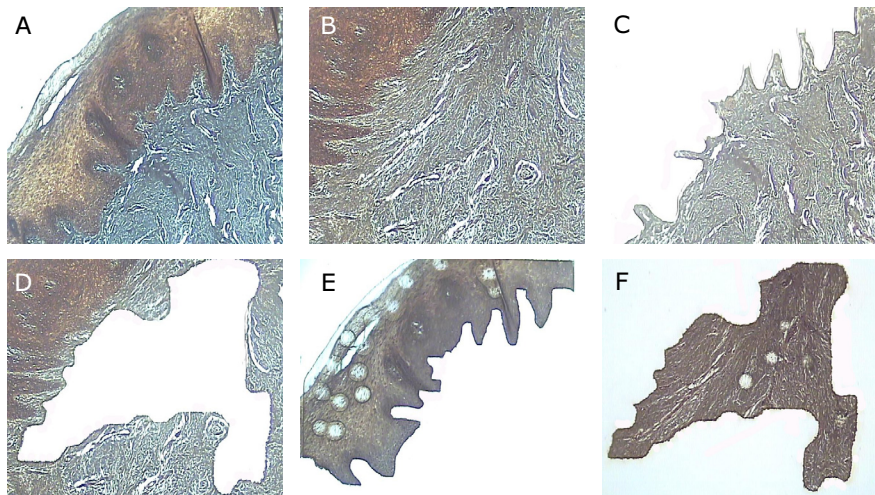


Fig. 1. Laser capture microdissection of epithelial cells and fibroblasts from oral leukoplakia lesions  
A, B: Before LCM, C: After LCM epithelium, D: After LCM stroma, E: Microdissected epithelium F: Microdissected stroma

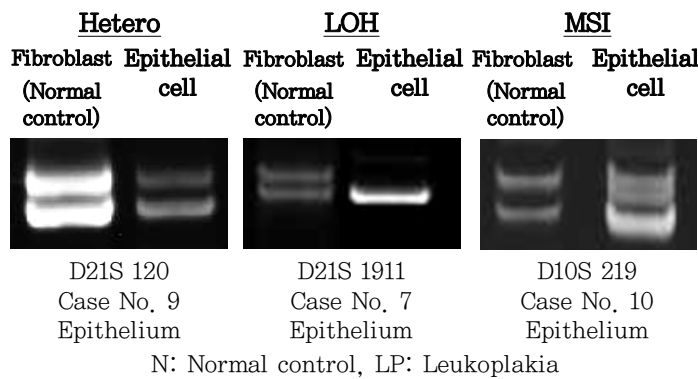


Fig. 2. The retention of heterozygosity (Hetero), the loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MSI) are shown in case 7, 9 and 10

Table 1. Information for 24 microsatellite markers in oral leukoplakia

Locus	Marker	Related Gene	Gene Function
3p14~25	D3S1286	ANKRD28 (ankyrin repeat domain 28)	PPI 활성화에 따른 hnRNP K 전사활동 관여
	D3S1293	TGFBR2 (transforming growth factor, beta receptor II)	각종 암의 개시와 증식 유도
5q12.3	D5S2072	MAST4 (microtubule associated serine/threonine kinase family member 4)	소장, 대장, 백혈구를 제외한 정상 조직에서 고도 발현
5q22.2	D5S421	YTHDC2 (YTH domain containing 2)	DNA, RNA 이중 나선 분리
5q21~23	D5S644	Non-informed	Non-informed
6q25~27	D6S264	SUMO4 (SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 4)	1. 자가면역질환 관련 2. 제2형 당뇨병 환자의 신장 질환 관련 3. 세포내 압력 조절
		IDDM5 (insulin-dependent diabetes mellitus 5)	Non-informed
	D6S255	Non-informed	Non-informed
8p21~23	D8S261	PCM1 (pericentriolar material 1)	결손 시 만성 골수성 백혈병 관련
	D8S264	SCZD6 (schizophrenia disorder 6)	Non-informed
9p21~22	D9S162	SLC24A2 (solute carrier family 24, member 2)	결손 시 뇌, 망막 질환 유발
	D9S168	Non-informed	Non-informed
	D9S1749	MTAP (methylthioadenosine phosphorylase)	1. 암의 발달 진행에 관여 2. 두경부편평세포종, 골육종, 간편평세포종, 악성흑색종, 위식도암, 담낭관암, 맨틀 세포 임파선암 관련
9q32~33	D9S177	Non-informed	Non-informed
10q22~23	D10S219	LOC702311 similar to retinoic acid induced 17	Non-informed in human
10q25~26	D10S221	DEC (Deleted in endometrial carcinoma)	결손 시 자궁내막암 유발
		PDZD8 (PDZ domain containing 8)	Non-informed
11q22.3	D11S1778	C11orf65 (chromosome 11 open reading frame 65)	Non-informed
11q22.2	D11S4108	Non-informed	Non-informed
13q11.1~11.2	D13S260	Non-informed	Non-informed
17p12~14	D17S786	PIK3R5 (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101)	손상된 세포막 회복, phosphoinositide-3-kinase (PI3K- $\gamma$ ) 활성화
17q12~14	D17S579	DBF4B (DBF4 homolog B (S. cerevisiae))	세포주기 S기와 M기의 진행 관여
21q11.1~21.1	D21S120	STCHS (stress 70 protein chaperone, microsome-associated) 인접	심장병이 없는 집단에서 위암의 발생에 관련
	D21S1922	Non-informed	Non-informed
	D21S1904	MAGI1 (membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1) 인접	세포 표면 안정화, 세포 사이 연결에 관여
	D21S1911	Non-informed	Non-informed

Table 2. The information of the marker, cytogenetic localization and primer sequence of microsatellite markers

Marker	Cytogenic localization	Primer sequence	Annealing temperature (°C)
D3S1286	3p14~25	5'-TGTGTACCCGAAATATGGAG-3' 5'-CTATGTGTGGGTATTGACGG-3'	45
D3S1293	3p14~25	5'-CTGTAACCTCTGCAGATTTC-3' 5'-TGGAAATAGAACAGGGTGTG-3'	45
D5S2072	5q12,3	5'-GCACTTTGATACTGCTATCTCGTGA-3' 5'-CCTTGGGGCTGTGATGAA-3'	45
D5S421	5q22,2	5'-TGGAAATAGAAATCCAGGCTT-3' 5'-TCTATCGTTAACTTTATTGATTTCAG-3'	45
D5S644	5q21~23	5'-GGTAGATCAATGTGCCAAAA-3' 5'-CCTGCAAGTTATCAGCAGAC-3'	45
D6S255	6q25~27	5'-TCAGCATCAAGGTAGTTGAG-3' 5'-TTAGTGCCCTATGCAAGGCA-3'	50
D6S264	6q25~27	5'-GCTGACTTTATGCTGTTCTCC-3' 5'-TGAAAATTGTTCTATTCTGTGATGCC-3'	50
D8S261	8p21~23	5'-TGCCACTGTCTTGAAAATCC-3' 5'-TATGGCCCAGCAATGTGTAT-3'	45
D8S264	8p21~23	5'-ACATCTGCGTCGTCTTCATA-3' 5'-CCAACACCTGAGTCAGCATA-3'	45
D9S162	9p21~22	5'-GCAATGACCAGTTAAGGTTTC-3' 5'-AATTCCCACAACAAATCTCC-3'	45
D9S168	9p21	5'-GGTTTGTGGTCTTTGTAAGG-3' 5'-TGGTTTGTGTTGTATAACTATCATTG-3'	50
D9S1749	9p21	5'-AGGAGAGGGTACGCTTGCAA-3' 5'-TACAGGGTGCGGGTGAGATAA-3'	50
D9S177	9q32~33	5'-CAGGGGTGAGAAATCTTAAAG-3' 5'-CCCTTCATACAAAACTACCAC-3'	45
D10S219	10q22~23	5'-TCTTTCTACCACCCCC-3' 5'-GCAGAGAACCTAAAGCATCC-3'	45
D10S221	10q25~26	5'-CTACACATTGTCAGTCCATG-3' 5'-GGAACATTAATTGTGGTGGA-3'	50
D11S1778	11q22,3	5'-TAACCTNCTACACAGTGTGTT-3' 5'-GCTTCAGCAGAGAAGCCAT-3'	50
D11S4108	11q22,2	5'-TGGCAAGTGGCAGGAT-3' 5'-GCCCATAGATGGATGAGTAGA-3'	50
D13S260	13p11,1~11,2	5'-TCAGATTGCTAAGCATGTACC-3' 5'-CCAGATATAAGGACCTGGCT-3'	50
D17S579	17q12~14	5'-AGTCCTGTAGACAAAACCTG-3' 5'-CAGTTTCATACCAAGTTCCT-3'	50
D17S786	17p12~14	5'-TACAGGGATAGGTAGCCGAG-3' 5'-GGATTTGGGCTCTTTGTAA-3'	50
D21S120	21q11,1~21,1	5'-GTGTGTCTGCCATTTCTGGGTGTAG-3' 5'-GATCCTGGGACAAAGTAGTCTCTAA-3'	50
D21S1904	21q11,1~21,1	5'-ATGAGTTCAGTGTTCATGGACATC-3' 5'-AGCAAGATTACTGTCTGGTTTCCC-3'	50
D21S1911	21q11,1~21,1	5'-AGCTCCTGAGGAGACATCC-3' 5'-TCCCTTACATACACACAGCA-3'	45
D21S1922	21q11,1~21,1	5'-ATGCTATCTTGTCAAAATATGTG-3' 5'-TGGAAATATATAACAAATCACTGG-3'	50

되었다. LOH 결과를 염색체별로 비교하여 보았을 때는 11번 염색체에서 6예(5명)의 LOH가 관찰되어 가장 많은 빈도를 보였다(Table 4). 유전자 위치별로 비교하여 보면 8p21~23 부위의 D8S261(4/16명, 25.00%)에서 4예(4명)로 가장 많은 수의 LOH가 발견되었으며, 염색체 9p21~22, 11q22.2~3, 21q11.1~21.1 부위에서 많이 관찰되었다(Table 7).

## 2) 구강백반증 상피 세포에서의 MSI

구강백반증 상피세포에서 MSI는 5q21~23(D5S644), 10q25~26(D10S219), 11q22.3(D11S1778) 부위에서 각각 1 예씩 모두 3예(3명) 발견되었으며 나머지 부위에서는 MSI가 관찰되지 않았다(Table 4).

## 3) 구강백반증 섬유모세포에서의 LOH

정상 대조군으로 사용한 구강백반증 섬유모세포에서도 LOH가 관찰되었는데, 구강백반증의 상피세포에서는 정상이었으나 섬유모세포에서 LOH가 나타난 경우가 23예(13명)였고 이를 유전자 위치별로 비교하여 보면 21q11.1~21.1 부위

의 D21S1911에서 5예를 보여 가장 많은 빈도(5/15명, 33.33%)를 보였다(Table 5).

## 4) 구강백반증 섬유모세포에서의 MSI

정상 대조군으로 사용한 구강백반증 섬유모세포에서의 MSI가 관찰되었는데, 구강 백반증의 상피 세포에서는 정상이었으나 섬유모세포에서 MSI가 관찰된 경우가 8예(6명) 있었으며 MSI는 D17S786 부위에서 2예, D5S421, D10S219, D10S221, D11S1778, D21S120, D21S1911 부위에서 각각 1 예씩 발견되었다(Table 5).

## 5) 구강백반증 상피세포와 섬유모세포에서 유전자 변이가 모두 나타난 경우

상피세포와 섬유모세포 양쪽에서 LOH나 MSI가 발견된 경우는 17예(12명)였으며 상피세포에서 MSI, 섬유모세포에서 LOH가 관찰된 경우는 4예(3명) 있었으며 상피세포에서 LOH가, 섬유모세포에서 MSI가 관찰된 경우는 1예 관찰되었다(Table 5, 6, 7).

Table 3. Clinical and histological data for 16 cases of oral leukoplakia

Case	Age	Sex	Sampling site	Pathologic diagnosis
1	29	M	Rt. Mn	HK and AC
2	43	M	Rt. BM	HK and AC
3	65	M	Rt. Mn	HK and AC
4	59	F	Lt. Tongue	HK and AC
5	62	M	Vent. Tongue	HK
6	66	M	Rt. BM	HK with MED
7	70	F	Mx	HK with MED
8	61	M	Rt. BM	HK
9	59	F	Ant. Tongue	HK
10	72	M	Lt. Mn	HK and AC with MED
11	48	M	Rt. BM	HK
12	53	M	Rt. Tongue	HK
13	53	M	Retromolar area	HK
14	67	M	Rt. Tongue	HK with MED
15	61	M	Lt. Mn	HK
16	32	M	Retromolar area	HK and AC

M: male, F: female, Rt.: right, Lt.: left, Mn: mandibular gingiva, Mx: maxillary gingiva, Vent.: ventral, Ant: anterior, BM: buccal mucosa, HK: hyperkeratosis, AC: acanthosis, MED: mild epithelial dysplasia

Table 4. The frequency of LOH and MSI of epithelial cells in oral leukoplakia according to MSI markers

Locus	Epithelial cell/Fibroblast	LOH/Normal	MSI/Normal
		Patients (Cases)	Patients (Cases)
	3p	1 (1)	0 (0)
	5q	2 (2)	1 (1)
	6q	1 (1)	0 (0)
	8p	4 (4)	0 (0)
	9p	4 (4)	0 (0)
	9q	2 (2)	0 (0)
	10q	1 (1)	1 (1)
	11q	5 (6)	1 (1)
	13q	0 (0)	0 (0)
	17p	0 (0)	0 (0)
	17q	0 (0)	0 (0)
	21q	4 (5)	0 (0)

Table 5. The frequency of genetic discrepancy between epithelial cell and fibroblasts of oral leukoplakia according to MSI markers

Locus	Epithelial cell/Fibroblast	Normal/LOH	Normal/MSI	MSI/LOH	LOH/MSI
		Patients (Cases)	Patients (Cases)	Patients (Cases)	Patients (Cases)
	3p	3 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	5q	2 (2)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
	6q	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
	8p	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	9p	3 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	9q	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	10q	2 (2)	1 (2)	1 (1)	0 (0)
	11q	2 (2)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
	13q	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	17p	2 (2)	2 (2)	0 (0)	1 (1)
	17q	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	21q	5 (5)	2 (2)	1 (1)	0 (0)

### 3. 상피 이형성의 유무에 따른 LOH 분석

실험에 사용된 16명의 구강백반증 환자 조직 중 4예에서 정도의 상피이형성이 관찰되었다. 상피이형성이 없는 구강백반증 조직과 상피이형성이 있는 조직의 LOH와 MSI 발현 빈도는 통계학적으로 유의성이 없었다.

## IV. 총괄 및 고찰

구강백반증은 정상조직이 구강편평세포암종으로 이행하기 전단계인 전암병소이며 상피이형성의 여부에 따라 악성으로 진행되는 빈도가 달라진다<sup>2-6)</sup>. 이렇게 다단계로 진행되는 악성 암종은 대부분이 LOH나 MSI 같은 유전자 변이의 축적에 의해 나타나며 실제로 인체의 여러 종양에서 염색체의 소실 또는 결손이 흔하게 관찰된다<sup>34,35)</sup>. 따라서 본 연구에서는 구강편평세포암종의 대표적 전암병소인 구강백반증에서 유전자 변이를 관찰하기 위해 상피세포와 섬유모세포를 각각 분리하여 LOH/MSI를 확인하였다. 상피세포와 섬유모세포의 정확한 분리를 위해 LCM 기법을 사용하여 미세절

제하였고 상피의 증대가 현저한 조직은 수동식으로 미세절제하였다.

대립유전자의 소실 여부를 파악하는 LOH 분석법은 중앙 억제 유전자의 존재와 함께 유전자의 특정 위치를 밝혀낼 수 있는데<sup>36-39)</sup> 본 연구에서는 구강백반증에서 그 발생기전에 작용하는 주요 유전자의 염색체내 위치에 대한 24종의 MSI 표지자를 선정하여 구강백반증의 상피세포에서 LOH/MSI 여부를 알아보았다. 관찰한 염색체의 위치는 3p, 5q, 6q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11q, 13q, 17p, 17q, 21q였으며 기존의 구강편평세포암종과 구강백반증 조직에서 LOH가 나타난 염색체 위치를 나열한 후 가장 많은 LOH가 발견된 순서대로 해당 위치에 대한 표지자를 선정하였다.

실험 결과 모든 환자의 구강백반증 조직의 상피세포에서 LOH가 발견되었고, 염색체 11q22.2~3, 8p21~23, 9p21~22, 21q11.1~21.1 부위에서 많이 관찰되었다. 이는 구강편평세포암종과 구강백반증에서 LOH가 많이 발견된 기존 연구결과에서 언급되었던 유전자의 위치와 일치하였다. MSI는 5q21~23(D5S644), 10q25~26(D10S219), 11q22.3(D11S1778) 부위에서 각각 1예씩 발견되었다.

Table 6. The frequency of showing the same genetic instability pattern of epithelial cells and fibroblasts in oral leukoplakia according to MSI markers

Locus	Epithelial cell/Fibroblast	Normal/Normal Patients (Cases)	LOH/LOH Patients (Cases)	MSI/MSI Patients (Cases)
3p		9 (10)	4 (4)	0 (0)
5q		10 (15)	0 (0)	0 (0)
6q		16 (18)	0 (0)	0 (0)
8p		12 (16)	0 (0)	0 (0)
9p		15 (35)	4 (4)	0 (0)
9q		3 (3)	0 (0)	0 (0)
10q		7 (10)	0 (0)	0 (0)
11q		13 (17)	1 (1)	1 (1)
13q		1 (1)	0 (0)	0 (0)
17p		5 (5)	1 (1)	0 (0)
17q		9 (9)	0 (0)	0 (0)
21q		16 (31)	6 (5)	0 (0)



Table 7. The frequency of genetic instability of oral leukoplakia according to MSI markers

Locus \ Case	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
3p	D3S1286	NI	NI	□	NI	NI	□	NI	NI	□	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	D3S1293	●	□	●	□	■	□	□	□	●	NI	□		□		
5q	D5S2072	NI	□	NI	NI	NI	□	□	NI	NI	NI	□	NI	NI	NI	NI
	D5S421	NI	●	NI	NI	□	NI	□	▲	NI	NI	⊖	NI	NI	NI	NI
	D5S644	NI	□	≡	□	■	□	□	□	□	□	□	NI	●	NI	■
6q	D6S264	□	□	NI	NI	NI	NI	NI	▲	NI	NI	NI	□	NI	■	NI
	D6S255	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
8p	D8S261	■	■	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□	□	■
	D8S264	NI	NI	NI	NI	NI	□	□	NI	□	NI	NI	□	NI	NI	NI
9p	D9S162	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	NI	NI
	D9S168			■	□	□		□	□		□	□	□	■	□	■
	D9S1749	□	□	□	□	□	●	■	□	●	□	□	□	□	●	□
9q	D9S177	NI	□	NI	NI	■	●	NI	■	□	NI	NI	□	NI	NI	NI
10q	D10S219	NI	⊖	□	□	■	□	□	□	□	≡	NI	□	NI	●	NI
	D10S221	NI	⊖	NI	□	NI	□	▲	NI	□	NI	NI	●	NI	NI	NI
11q	D11S1778	□	□	⊖	■	□	≡	■	□		●		□	●	□	NI
	D11S4108	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■	■	□	NI	NI	■
13q	D13S260	NI	□	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	●	NI	NI	NI
17p	D17S786	□	●	NI	●	□	⊖	□	⊖	□	NI	NI	□	NI		△
17q	D17S579	●	□	□	□	NI	□	□	●	□	NI	NI	□	NI	□	□
21q	D21S120	NI	NI	NI		⊖		NI	■	□	□	NI	NI	NI	NI	□
	D21S1922	□	□	NI	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	D21S1904	□	□	□	□	□		□			□	□	□	NI	■	●
	D21S1911	▲	●	●	■	●	□	■	□	□	□	⊖	●	NI	■	NI

NI: Not informative, □: Normal epithelium/Normal fibroblast

■: LOH epithelium/Normal fibroblast, ≡: MSI epithelium/Normal fibroblast

□: LOH epithelium/LOH fibroblast, MSI epithelium/MSI fibroblast

●: Normal epithelium/LOH fibroblast, ⊖: Normal epithelium/MSI fibroblast

▲: MSI epithelium/LOH fibroblast, △: LOH epithelium/MSI fibroblast

D8S261은 8번 염색체 8p22 근처에 위치하는 염색체로서 8p21~23 부위에서는 현재 2부위의 종양 억제 유전자의 가능성이 제시되고 있다. 이 부분의 유전자 변이는 전립선암, 대장암, 방광암, 신장의 collecting duct carcinoma, 두경부 편평세포암종의 진행 단계에 연관되는 것으로 보고되었으며, 유방암의 초기 단계에 관여하는 유전자로 생각되고 있다<sup>40, 41</sup>. 식도암의 경우 이 부위의 유전자 증폭이 있을 경우 cathepsin B의 과발현이 일어나며 위암에서도 D8S261 부위의 LOH가 있는 경우 leucine-zipper protein인 Fez1 단백질이 발현되지 않음을 보고하였다<sup>42</sup>. 후두암에서는 D8S261의 LOH와 최소한 8p21, 8p22-23, 8p23.3의 세군데의 종양억제 유전자로서의 가능성을 보고하였으며<sup>43</sup> D8S264의 LOH가 연관된 경우 예후가 좋지 않음을 보고하여<sup>44</sup> 8p2~23 부위에서의 종양억제 유전자의 가능성을 제시하였다. 본 연구 결과에서는 D8S264에서는 LOH가 관찰되지 않았다. 다른 암종에서도 D8S264의 LOH 빈도가 D8S261보다 낮은 것으로 보고되었으며, 8p21~23 부위의 초기 구강암 발생 단계에서 작용하는 종양 억제 유전자로서의 가능성이 있다고 생각된다.

염색체 9p21~22 부위는 구강편평세포암종에서 LOH가 가장 많이 관찰된 유전자 위치 중 하나이며 구강편평세포암종 외에 인체의 여러 암의 발생과 구강백반증의 형성에도 관여한다<sup>45-47</sup>. D9S162, D9S168, D9S1749 유전자 부위는 p16 단백질을 coding하는 p16INK4를 탐지하는 표지자이다<sup>48</sup>. p16은 cell cycle을 조절하는 역할을 하는 CDKN를 coding한다. CDKN는 cell cycle regulation과 함께 p21, Rb gene, p53 유전자와 연관되어 세포의 자멸사를 유도하는 역할을 하게 된다<sup>48</sup>. 이 부위에 존재하는 유전자는 MTAP (methylthioadenosine phosphorylase)로 이는 주로 p16 유전자와 함께 소실되기 때문에 두경부 편평세포암종뿐만 아니라 골육종, 간편평세포종, 악성흑색종, 위식도암, 담낭관암, 맹장 세포 임파선암 등 다수의 암에서 소실이 보고되었다<sup>49-55</sup>. 구강암 종양화 과정에서는 p16 유전자 부위가 불활성화됨으로서 종양 억제 유전자의 기능을 상실하게 되어 종양 발생이 일어날 수 있을 것으로 생각된다. 이 부위의 중합연쇄반응 결과 총 8예의 유전자 변이가 나타났다. 후두암의 경우에는 암종 부위 근처의 정상적인 점막에서도 D9S171의 LOH가 일어남을 관찰하여 두경부 암종의 초기 발생 과정에서 9p21의 유전자 변이가 관여함을 보고하였으며

<sup>43</sup> 본 연구 결과에서도 상피 이형성이 없는 부위에서도 9p21~22 부위의 LOH가 나타나 구강편평세포암종의 다단계 발생 과정의 비교적 초기에서 유전자 변이가 일어나는 것으로 생각된다.

D11S1778, D11S4108은 11q22.2~q22.3에 위치하는 유전자로서 구강편평세포암종에서 LOH 발현이 보고되었다<sup>7, 56</sup>. Zhou 등은 상피이형성이 있는 부위에서 LOH를 보고하여 이 부위의 종양억제 유전자의 가능성을 제시하였으며<sup>7</sup> 구강편평세포암종으로 진행한 구강백반증의 경우 11q22.2~q22.3 부위의 LOH와 MSI 빈도가 높음을 나타내어 구강편평세포암종의 진행과정에 이 부위의 유전자 변이가 관여할 가능성을 시사하였다<sup>56</sup>.

염색체 21q11.1~21.1 부위를 탐지한 표지자는 D21S120, D21S1911, D21S1922, D21S1904이며 이 부위의 유전자 변이는 폐암, 유방암, 식도암, 난소암, 구강암 등에서 보고되었다<sup>8</sup>. 가장 흔하게 유전자 변이가 일어나는 부위는 21q11~q21이며 이 부위의 28개 mapped gene에서 9부위만이 구조와 기능이 밝혀져 있으나 사람암종의 발생에서 어떤 역할을 하는지는 알려져 있지 않다<sup>8</sup>. Chen 등의 연구에서는 구강편평세포암종에서 D21S120, D21S1911, D21S1922, D21S1904 부위의 LOH 빈도를 보고하였으며 D21S120 부위의 유전자 변이는 구강편평세포암종의 임상 병기와 밀접한 관련이 있으며 종양 진행에서 역할을 하는 것으로 생각하였다.<sup>8</sup> 또한 구강편평세포암종 환자의 예후와도 연관이 있는 것으로 보고하였다.<sup>8</sup>

염색체 3p14~25 부위의 LOH를 관찰하는 표지자는 D3S1286과 D3S1293을 사용하였다. 이 중 D3S1293은 각종 암의 개시와 증식에 관여하는 대표적 종양억제 유전자인 transforming growth factor beta receptor type II (TGFB2)를 탐지하는 표지자로 이용되고 있다. 본 실험의 결과에서는 16예 중 4예의 구강백반증 조직에서 상피세포에서 TGFB2 유전자의 LOH가 나타남을 확인하여 구강암 발암과정에서 상피세포와 섬유모세포 유전자 변이가 상피세포의 종양화에 작용할 가능성이 있다고 생각된다.

6q25~27 부위의 D6S264 표지자에 해당하는 유전자는 SUMO4(SMT3 supressor of mif two 3 homolog 4)이며 이는 제1, 2형 당뇨병에 관여한다고 알려져 있다<sup>57, 58</sup>. 그러나 SUMO4가 구강암에 관여하는 종양 억제 유전자로서의 역할을 하는지에 대한 여부는 아직 밝혀지지 않았다.

본 연구에서 정상 대조군으로 사용한 섬유모세포의 유전자 변이 분석 결과 다수의 LOH와 MSI가 관찰되었다. 구강백반증의 상피세포에서는 정상이었으나 섬유모세포에서 LOH가 나타난 경우가 22예였고 이를 유전자 위치별로 비교하여 보면 21q11.1~21.1 부위의 D21S1911에서 가장 많은 빈도를 보였다. 구강백반증의 상피세포에서는 정상이었으나 섬유모세포에서 MSI가 관찰된 경우는 8예가 발견되었다.

구강백반증 조직의 섬유모세포에서 MSI가 많이 발견되었던 염색체 부위는 10q22~23와 5q12~23부위인데, 10q22~23 위치에는 자궁내막암 유발과 관련 있는 DEC(deleted in endometrial carcinoma) 유전자와<sup>59)</sup> PDZD8(PDZ domain containing 8) 유전자가 존재한다. 염색체 5q12~23 부위에 존재하는 유전자가 사람의 암에서 어떠한 역할을 하는지는 아직 밝혀지지 않았다.

구강백반증의 상피세포와 섬유모세포의 유전자 변이 분석 결과 상피세포와 정상 대조군으로 사용한 섬유모세포의 DNA가 함께 band의 소실을 보인 경우가 관찰되었다. 이러한 경우는 환자의 genetic polymorphism을 보이는 경우나 상피세포와 섬유모세포의 DNA가 함께 유전자 손상을 받아 유전자 변이를 일으켰을 가능성도 배제할 수 없다고 생각된다. 환자가 genetic polymorphism을 보이는 경우 상피세포의 유전자 변이 여부를 판단하기 위해서는 정상 대조군과 함께 상피세포의 gene sequencing이 필요하다. 또한 구강백반증 환자의 상피세포와 섬유모세포 양쪽에서 LOH를 일으켰을 가능성도 있을 수 있으므로 이 경우 암종 진행 과정에서 상피세포 인접 섬유모세포가 유전자 변이를 일으켰을 가능성이 있으므로 림프절이나 말초 혈액의 혈구 세포에서 DNA를 추출하여 정상 대조군으로 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다. 또한 본 연구에서는 조직 생검 이후 paraffin block에 포매한 조직에서 DNA를 추출하여 사용하였으므로 paraffin block의 포매 과정에서 유전자의 손상이나 변형이 일어났을 가능성도 배제할 수 없다. 본 연구의 단점을 보완하기 위해서는 구강암의 field cancerization에 영향을 받지 않는 인체의 타 부위에서 정상 조직을 추출하여 정상 대조군으로 사용하며 되도록 유전자 손상을 줄일 수 있는 조직 보관 방법을 이용한 조직에서 유전자 변이를 관찰하는 것이 필요하다. 구강백반증의 상피세포와 섬유모세포 양쪽에서 MSI를 보이는 경우는 구강백반증 상피세포와 섬유모세포의 종양화 과정에서 일어나는 세포의 heterogeneity에 의

하여 유전자의 MSI를 보였을 가능성이 있을 것으로 추측된다.

구강백반증의 유전자 변이를 연구한 선행 연구에서는 대부분의 경우에서 정상 대조군으로 섬유모세포를 사용하였는데 섬유모세포의 유전자 변이 여부에 대해서는 자세한 언급을 하지 않았다. 본 연구에서는 LOH가 일어난 섬유모세포의 일부 표지자의 PCR 산물에서 sequencing을 시행하였는데 대부분의 경우 중합 산물의 gene deletion을 보여 전기영동 소견을 뒷받침하였다(Data not shown). 본 연구에서는 섬유모세포의 DNA 또한 구강상피세포의 백반증 변화 소견과 동반하여 변화를 보였다고 생각된다. 정상조직이 악성 암종으로 진행하는 과정에는 암 주위의 여러 조직이 관여하는데<sup>34-38)</sup> 이 중 상피와 인접한 섬유모세포는 암조직과 상호작용을 하면서 암의 발달과 진행을 돕는 역할을 한다<sup>36-38)</sup>. 또한 조직이 악성 암종으로 진행할 때 상피세포뿐만 아니라 주위의 섬유모세포도 종양화의 영향을 받는다는 내용의 연구가 많이 보고되고 있다. 구강백반증 뿐만 아니라 전립선암과 자궁경부암 등 다단계로 진행되는 다른 암종의 전암병소 단계에서도 상피와 섬유모세포 모두 유전자의 변이가 확인되었다<sup>60,61)</sup>. 본 연구 결과만으로는 구강백반증의 상피세포와 섬유모세포가 어떠한 기전으로 구강백반증의 발생 과정에 기여하는지 명확하게 밝히기는 어려우나 구강암의 초기 발생 기전에서 상피세포뿐 아니라 섬유모세포에서도 다수의 유전자 변이가 일어난다고 생각되며 이들 유전자 변이의 축적된 결과로 인하여 다단계 구강암 발생 과정이 진행되는 것으로 추측된다.

구강백반증의 상피세포의 유전자에서는 정상이었으나 섬유모세포에서 LOH나 MSI를 보이는 경우 2가지의 가능성을 생각할 수 있다. 구강백반증의 상피세포와 섬유모세포의 genetic imbalance이거나 섬유모세포의 유전자에서 LOH를 일으켰을 가능성이 있다. 이러한 경우 상피세포의 유전자를 정상으로 판단할 수 있는지의 여부는 섬유모세포의 유전자와의 비교만으로는 어려우며 동일 환자의 다른 신체 부위에서 채취한 정상 세포를 정상대조군으로 비교해야 할 것으로 생각된다. 또한 구강백반증에서 상피세포와 섬유모세포의 genetic imbalance가 상피 이행성 발현이나 구강편평세포 암종으로 진행되는 과정에서 어떠한 역할을 하는지는 추후 연구를 통하여 밝혀야 할 것이다.

본 연구 결과 구강백반증세포에서 LOH나 MSI를 보여 염색체 불안정성이 있는 것으로 밝혀진 부위는 선행 연구에서

종양 억제 유전자로 밝혀진 경우도 있고 아직 그 기능이 밝혀지지 않은 경우도 있으나 이들 유전자가 종양 억제 유전자로 작용할 가능성을 제시하고 있다. 본 연구에서는 염색체 8p21~23, 9p21~22, 11q22.2~3, 21q11.1~21.1 부위 등의 유전자가 구강백반증의 종양 억제 유전자로서 기능할 가능성이 있다고 생각되며 다단계 구강암발생과정의 비교적 초기 단계에서 유전자 변이가 일어나는 것으로 생각된다. 본 실험에서 관찰한 유전자 중 대부분은 구강편평세포암종과 구강백반증과의 연관성이 아직 밝혀지지 않았으나 구강편평세포암종의 LOH/MSI를 연구한 많은 논문에서 이들 유전자의 결손을 밝혔으므로 이들 유전자의 염색체 불안정성과 구강백반증과의 관련성이 차후에 증명될 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구결과에서 구강백반증 조직의 LOH가 실험에서 관찰한 모든 염색체의 위치에서 나타났기 때문에 구강백반증에 관여하는 유전자는 현재 예측되고 있는 수보다 많을 것이며, 앞으로도 해당 유전자가 계속 밝혀질 것으로 생각된다. 추후의 연구들을 통해 앞으로 구강편평세포의 종양화 단계에 관여하는 특정 유전자를 정의할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결론

구강편평세포암종의 전암병소인 구강백반증에서 상피와 섬유모세포의 이형접합성소실(LOH)과 현미부수체 불안정성(MSI)을 분석한 결과 구강백반증의 상피세포에서 다수의 LOH와 MSI를 관찰하였으며 섬유모세포에서도 유전자 변이가 나타난다는 사실을 확인하였다. 이와 같은 결과로 다단계로 진행되는 구강편평세포암종의 전암병소인 구강백반증 조직에서 비교적 초기 단계에서 다수의 유전자 변이가 발생한다는 사실과 염색체 8p21~23, 9p21~22, 11q22.2~3, 21q11.1~21.1 부위에서 LOH/MSI가 다수 발생함을 알 수 있었다. 앞으로 상피이형성이 있는 표본을 추가함으로써 다단계 종양화에서 상피이형성 관련 유전자 변이를 확인할 수 있을 것으로 생각한다.

이상의 연구 결과에서 구강백반증 조직의 상피와 섬유모세포 모두에 LOH/MSI가 나타남을 확인하였다. LOH는 구강백반증 전체 조직에서 나타났고 MSI는 특정한 일부 조직에서만 발견이 되었다. 이러한 결과로 보아 구강편평세포암종의 초기단계인 구강백반증에서도 상피세포의 유전자 변이

와 더불어 섬유모세포의 유전자 변이도 동반됨을 알 수 있었다. 향후 이를 근거로 암 발생 초기 단계에 상피-섬유모세포 상호작용에 대한 규명이 필요할 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

1. Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. Contemporary oral and maxillofacial pathology. 2nd edition, St. Louis, Missouri: Mosby 2004, pp 173-185.
2. Piscopo M, Campisi G, Colella G, Bilancione M, Caccamo S, Di Liberto C et al. H3 and H3.3 histone mRNA amounts and ratio in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia. Oral Dis 2006;12:130-136.
3. Mutirangura A, Supiyaphun P, Triekapan S, Sriuranpong V, Sakuntabhai A, Yenrudi S et al. Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res 1996;56:3530-3533.
4. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S, Flushing NY. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995;79:321-329.
5. Burkhardt A. Advanced methods in the evaluation of premalignant lesions and carcinomas of the oral mucosa. J Oral Pathol 1985;14:751-758.
6. Hayward JR, Regezi JA. Oral dysplasia and in situ carcinoma: Clinicopathologic correlation of eight patients. J Oral Surg 1977;35:756-762.
7. Zhou X, Jordan RC, Li Y, Huang BL, Wong DT. Frequent allelic imbalances at 8p and 11q22 in oral and oropharyngeal epithelial dysplastic lesions. Cancer Genet Cytogenet 2005;161:86-89.
8. Chen L, Wong MP, Cheung LK, Samaranayake LP, Baum L, Samman N. Frequent allelic loss of 21q11.1 approximately q21.1 region in advanced stage oral squamous cell carcinoma. Cancer Genet Cytogenet 2005;159:37-43.
9. Uzawa N, Akanuma D, Negishi A, Iwaki H, Uzawa Y, Amagasa T et al. Homozygous deletions on the short arm of chromosome 3 in human oral squamous cell carcinomas. Oral Oncol 2001;37:351-356.
10. Ransom DT, Leonard JH, Kearsley JH, Turbett GR, Heel K, Sosars V et al. Loss of heterozygosity stud-

- ies in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck* 1996;18:248–253.
11. Gleich LL, Li YQ, Biddinger PW, Gartside PS, Stambrook PJ, Pavelic ZP et al. The loss of heterozygosity in retinoblastoma and p53 suppressor genes as a prognostic indicator for head and neck cancer. *Laryngoscope* 1996;106:1378–1381.
  12. El-Naggar AK, Hurr K, Huff V, Luna MA, Goepfert H, Batsakis JG. Allelic loss and replication errors at microsatellite loci on chromosome 11p in head and neck squamous carcinoma: association with aggressive biological features. *Clin Cancer Res* 1996;2:903–907.
  13. Partridge M, Emilion G, Langdon JD. LOH at 3p correlates with a poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1996;73:366–371.
  14. Ono K, Miyakawa A, Fukuda M, Shiiba M, Uzawa K, Watanabe T et al. Allelic loss on the short arm of chromosome 8 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 1999;6:785–789.
  15. Nakanishi H, Wang XL, Imai FL, Kato J, Shiiba M, Miya T et al. Localization of a novel tumor suppressor gene loci on chromosome 9p21–22 in oral cancer. *Anticancer Res* 1999;19:29–34.
  16. Wang XL, Uzawa K, Imai FL, Tanzawa H. Localization of a novel tumor suppressor gene associated with human oral cancer on chromosome 4q25. *Oncogene* 1999;18:823–825.
  17. Yamamoto N, Mizoe JE, Numasawa H, Yokoe H, Uzawa K, Shibahara T et al. Allelic loss of chromosome 2 in human oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis. *Oral Oncol* 2003;39:64–68.
  18. Arai K, Shibahara T, Yamamoto N, Noma H. The presence of candidate tumor suppressor gene loci at chromosome 3p for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2002;38:763–771.
  19. Jiang WW, Fujii H, Shirai T, Mega H, Takagi M. Accumulative increase of loss of heterozygosity from leukoplakia to foci of early cancerization in leukoplakia of the oral cavity. *Cancer* 2001;92:2349–2356.
  20. Zhang L, Cheung KJ, Lam WL, Cheng X, Poh C, Priddy R et al. Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites: potential impact on staging and clinical management. *Cancer* 2001;91:2148–2155.
  21. Mao L, Lee JS, Fan YH, Ro JY, Batsakis JG, Lippman S et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med* 1996;2:682–685.
  22. Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, A' Hern R, Phillips E. Allelic imbalance at chromosomal loci implicated in the pathogenesis of oral precancer, cumulative loss and its relationship with progression to cancer. *Oral Oncol* 1998;34:77–83.
  23. Rosin MP, Cheng X, Poh C, Lam WL, Huang Y, Lovas J et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000;6:357–362.
  24. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816–819.
  25. Chu EH, Boehnke M, Hanash SM, Kuick RD, Lamb BJ, Neel JV et al. Estimation of mutation rates based on the analysis of polypeptide constituents of cultured human lymphoblastoid cells. *Genetics* 1988;119:693–703.
  26. Loeb LA. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994;54:5059–5063.
  27. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993;53:5853–5855.
  28. Matsumura Y, Tarin D. DNA fingerprinting survey of various human tumors and their metastases. *Cancer Res* 1992;52:2174–2179.
  29. Wang X, Fan M, Chen X, Wang S, Alsharif MJ, Wang L et al. Intratumor genomic heterogeneity correlates with histological grade of advanced oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006;42:740–744.
  30. Wang XH, Fan MW, Sun ZJ, Chen XM, Wang L, Li Y. The TP53 and RPS6 alterations at the invasive tumor front, center and stroma of oral squamous cell carcinoma. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2007;42:140–143.
  31. Weber F, Xu Y, Zhang L, Patocs A, Shen L, Platzer

- P et al. Microenvironmental genomic alterations and clinicopathological behavior in head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA* 2007;297:187-195.
32. Stanbridge EJ. Human tumor suppressor genes. *Annu Rev Genet* 1990;24:615-657.
33. Hayashido Y, Nakashima M, Urabe K, Yoshioka H, Yoshioka Y, Hamana T, Kitano H, Koizumi K, Okamoto T. Role of stromal thrombospondin-1 in motility and proteolytic activity of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2003;12:447-452.
34. Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, Lee JS, Fan YH, Clayman G et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene* 1997;14:1799-1803.
35. Harlinde De Schuttera, Barbara Barba, Marijke Spaepenc, Adrian C. Beggd, Alfons Balme et al. Microsatellite alterations in head and neck squamous cell carcinoma and relation to expression of pimonidazole, CA IX and GLUT-1. *Radiother Oncol* 2006;143-150.
36. Yuhang Wang. Cancer Classification Using Loss of Heterozygosity Data Derived from Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping Arrays. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2006;1:5864-5867.
37. Lasko D, Cavenee W, Nordenskjöld M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet* 1991;25:281-314.
38. Partridge M, Pateromichelakis S, Phillips E, Emilion GG, A'Hern RP, Langdon JD. A case-control study confirms that microsatellite assay can identify patients at risk of developing oral squamous cell carcinoma within a field of cancerization. *Cancer Res* 2000;60:3893-3898.
39. Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, A'Hern R, Phillips E, Langdon J. Allelic imbalance at chromosomal loci implicated in the pathogenesis of oral precancer, cumulative loss and its relationship with progression to cancer. *Oral Oncol* 1998;34:77-83.
40. Vocke CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, Florence CD, Jennings SB, Strup SE, Duray PH, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Linehan WM. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res* 1996;56:2411-2416.
41. Wang JC, Radford DM, Holt MS, Helms C, Goate A, Brandt W, Parik M, Phillips NJ, DeSchryver K, Schuh ME, Fair KL, Ritter JH, Marshall P, Donis-Keller H. Sequence-ready contig for the 1.4-cM ductal carcinoma in situ loss of heterozygosity region on chromosome 8p22-p23. *Genomics* 1999;60:1-11.
42. Vecchione A, Ishii H, Shiao YH, Trapasso F, Rugge M, Tamburrino JF, Murakumo Y, Alder H, Croce CM, Baffa R. Fez1/lzts1 alterations in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1546-1552.
43. Szukała K, Sowińska A, Wierzbicka M, Biczysko W, Szyfter W, Szyfter K. Does loss of heterozygosity in critical genome regions predict a local relapse in patients after laryngectomy? *Mutat Res* 2006;600:67-76. Epub 2006 Jul 11.
44. Sunwoo JB, Sun PC, Gupta VK, Schmidt AP, El-Mofty S, Scholnick SB. Localization of a putative tumor suppressor gene in the sub-telomeric region of chromosome 8p. *Oncogene* 1999;18:2651-2655.
45. 도홍직, 서성일, 김동원, 김일만, 임만빈, 손은익 외. 일차성 아교모세포종에서 염색체 9p21-22 부위 유전자의 이상. *대한병리학회지* 2002;제36권 제6호:394-399.
46. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet* 1995;11:210-212.
47. Muroya K, Nishimura G, Douya H, Hasegawa T, Ogata T. Diaphyseal medullary stenosis with malignant fibrous histiocytoma: further evidence for loss of heterozygosity involving 9p21-22 in tumor tissue. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33:326-328.
48. Worsham MJ, Chen KM, Tiwari N, Pals G, Schouten JP, Sethi S et al. Fine-mapping loss of gene architecture at the CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p14ARF, p16INK4a), and MTAP genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:409-415.
49. García-Castellano JM, Villanueva A, Healey JH, Sowers R, Cordon-Cardo C, Huvos A et al. Methylthioadenosine phosphorylase gene deletions are common in osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:782-787.
50. Schmid M, Malicki D, Nobori T, Rosenbach MD, Campbell K, Carson DA et al. Homozygous deletions

- of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) are more frequent than p16INK4A (CDKN2) homozygous deletions in primary non-small cell lung cancers (NSCLC). *Oncogene* 1998;17:2669–2675.
51. Hellerbrand C, Mhlbauer M, Wallner S, Schuierer M, Behrmann I, Bataille F et al. Promoter-hypermethylation is causing functional relevant down-regulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2006;27:64–72.
  52. Behrmann I, Wallner S, Komyod W, Heinrich PC, Schuierer M, Buettner R et al. Characterization of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma. *Am J Pathol* 2003;163:683–690.
  53. Powell EL, Leoni LM, Canto MI, Forastiere AA, Iocobuzio-Donahue CA, Wang JS et al. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in gastroesophageal carcinogenesis: evidence of homozygous deletion in esophageal noninvasive precursor lesions and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1497–1504.
  54. Karikari CA, Mullendore M, Eshleman JR, Argani P, Leoni LM, Chattopadhyay S et al. Homozygous deletions of methylthioadenosine phosphorylase in human biliary tract cancers. *Mol Cancer Ther* 2005;4:1860–1866.
  55. Marce S, Balague O, Colomo L, Martinez A, Holler S, Villamor N et al. Lack of methylthioadenosine phosphorylase expression in mantle cell lymphoma is associated with shorter survival: implications for a potential targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:3754–3761.
  56. Zhou X, Mok SC, Chen Z, Li Y, Wong DT. Concurrent analysis of loss of heterozygosity (LOH) and copy number abnormality (CNA) for oral premalignancy progression using the Affymetrix 10K SNP mapping array. *Hum Genet* 2004;115:327–330.
  57. Noso S, Ikegami H, Fujisawa T, Kawabata Y, Asano K, Hiromine Y et al. Genetic heterogeneity in association of the SUMO4 M55V variant with susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:3582–3586.
  58. Noso S, Fujisawa T, Kawabata Y, Asano K, Hiromine Y, Fukai A et al. Association of small ubiquitin-like modifier 4 (SUMO4) variant, located in IDDM5 locus, with type 2 diabetes in the Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2358–2362.
  59. Peiffer SL, Herzog TJ, Tribune DJ, Mutch DG, Gersell DJ, Goodfellow PJ. Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res* 1995;55:1922–1926.
  60. Wang F, McKeenan K, Yu C, Ittmann M, McKeenan WL. Chronic activity of ectopic type 1 fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase in prostate epithelium results in hyperplasia accompanied by intraepithelial neoplasia. *Prostate* 2004;58:1–12.
  61. Gius D, Funk MC, Chuang EY, Feng S, Huettnner PC et al. Profiling microdissected epithelium and stroma to model genomic signatures for cervical carcinogenesis accommodating for covariates. *Cancer Res* 2007;67:7113–7123.

